



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09157295 A**(43) Date of publication of application: **17.06.97**

(51) Int. Cl.

C07K 14/705
C07H 21/04
C12N 15/09
C12P 21/02
// A61K 31/70
A61K 38/00
A61K 38/00
(C12N 15/09 , C12R 1:91), (C12P 21/02
, C12R 1:19)

(21) Application number: **07344504**(22) Date of filing: **05.12.95**(71) Applicant: **KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN**(72) Inventor: **SEYA TSUKASA**
MATSUMOTO MISAKO(54) **MEMBRANOUS PROTEIN M161AG AND CYCLIC-DNA CAPABLE OF CODING THE SAME**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new membranous protein M161Ag, having a specific amino acid sequence, biosynthetically produced in relation to apoptosis of a cell, having actions on promotion of the clearance of a human myelocytic leuke mic cell and useful as a therapeutic agent, etc., for leukemia, etc.

SOLUTION: This new membranous protein M161Ag has an amino acid sequence represented by the formula or an amino acid sequence substantially the same as that of the amino acid sequence represented by the formula and is biosynthetically produced in relation to the apoptosis of a cell, capable of promoting the clearance of a cancer cell, especially a human myelocytic leukemic cell and useful as a therapeutic agent, etc., for leukemia, etc. The membranous protein M161Ag is obtained by extracting an mRNA from a P39 (+) strain which is a substrain of a myelocytic leukemic cell strain P39, preparing a cDNA library using the resultant mRNA, then screening the prepared cDNA library with a synthetic oligonucleotide capable of coding a part of an amino acid sequence of the membranous protein purified from the P39 (+) strain as a probe, integrating the resultant cDNA into a vector and carrying out the expression thereof in a host cell.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

1	21	31	41	51
61	71	81	91	101
111	121	131	141	151
161	171	181	191	201
211	221	231	241	251
261	271	281	291	301
311	321	331	341	351
361	371	381	391	401
411	421	431	441	451
461	471	481	491	501
511	521	531	541	551
561	571	581	591	601
611	621	631	641	651
661	671	681	691	701
711	721	731	741	751
761	771	781	791	801
811	821	831	841	851
861	871	881	891	901
911	921	931	941	951
961	971	981	991	1001

* : アミノ酸
 ** : 終止

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-157295

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 14/705			C 0 7 K 14/705	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			A 6 1 K 31/70	
// A 6 1 K 31/70		9282-4B	C 1 2 N 15/00	ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-344504

(22) 出願日 平成7年(1995)12月5日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 瀬谷 司

奈良県奈良市鶴舞西町2丁目10, E-106

(72) 発明者 松本 美佐子

奈良県生駒市北大和2丁目20-7

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

(54) 【発明の名称】 膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNA

(57) 【要約】

【解決手段】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Ag、及び前記アミノ酸配列をコードするcDNA。

【効果】 新規な膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNAを提供する。

PTO 2002-3859

S.T.I.C. Translations Branch

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Ag。

【請求項2】 図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードするcDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なタンパク質 M161Ag及び当該タンパク質をコードするcDNA 10 に関する。

【0002】

【従来の技術】 M161Agは、ヒト骨髄性白血病細胞株P39(+)に含まれる膜タンパク質であり、第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクローナル抗体の作成はすでになされている (Matsumoto et al., J. Exp. Med., 181, 115-125 (1995))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、様々な生理活性を有する膜タンパク質M161AgをコードするcDNAを単離し、該タンパク質のより効率的な利用手段を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、M161AgのN末端アミノ酸配列よりプローブを決定し、これを用いてP39のcDNAライブラリーから陽性クローンを単離することに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明は、図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質M161Agである。

【0005】 また、本発明は、図1に示すアミノ酸配列、又は図1に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードするcDNAである。以下、本発明を詳細に説明する。本発明のcDNAは、以下のようにしてクローニングすることができる。まず、精製されたM161Agのアミノ酸配列より、プローブを作成する。M161Agは骨髄性白血病細胞株P39の亜株であるP39(+)より、前記したJ. Exp. Med., 181, 115-125 (1995) 記載の方法に従って、単離精製することができる。P39は、ジャパニース・キャンサー・リサーチ・リソース・バンクが保管している。P39(+)亜株は、親株のP39(+)を低温(12℃)下、48時間培養し、アポトーシス耐性を獲得した株の中から得られる。

【0006】 次に、P39より、全mRNAを抽出し、これからcDNAを合成する。合成したcDNAを適当なベクターに挿入し、宿主となる微生物を形質転換し、cDNAライブラリーを作成する。P39(+)より、mRNAを抽出する方法は、市販のInvitrogen mRNA 抽 50

出キットにより行うことができる。cDNAのクローニングは、例えば、pCEV4ベクターの組み込まれたP39(+)細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。ベクターとしては、他にpBluescriptなどを用いることができる。形質転換する微生物としては、例えば、大腸菌株、MC1803などを用いることができる。スクリーニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行うことができる。

【0007】 クローニングされたcDNAの大きさは、約1.3kbであり、その塩基配列は図2及び図3に示す通りである。これから推定されるアミノ酸配列、即ち、M161Agのアミノ酸配列は、図1に示す通りである。図1に示すようにこのタンパク質の24個のシグナルペプチドを含む428個のアミノ酸からなり、推定分子量は42kDaである。

【0008】 本発明の対象となるタンパク質のアミノ酸配列は、図1に示す配列に限定されず、これと実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明の技術的範囲に含まれる。ここで、「実質的に同一」とは、図1に示すアミノ酸配列の幾つかのアミノ酸残基について、欠失、置換、付加等の変化が生じた配列であって、前記配列と同様に第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着など機能を有するような配列をも含むという意味である。同様に本発明のcDNAの塩基配列も、図1に示すアミノ酸配列をコードするものに限定されず、これと実質的に同一な塩基配列を有するDNAも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0009】 M161Agは、細胞のアポトーシスに関連して生合成される膜タンパク質であり、癌細胞、特にヒト骨髄性白血病細胞のクリアランスを促進する。従って、M161Ag及びそれをコードするcDNAは、白血病などの治療薬として利用することができる。

【0010】

【発明の実施の態様】

【0011】

【実施例】

【実施例1】 cDNAのクローニング

＜プローブの作成＞ M161Agを抗体(M161Ab, 文献J. Exp. Med., 181, 115-125 (1995) 参照)をプローブとしてP39(+)株 3×10^{10} 個の細胞可溶化画分より精製(精製法、上記文献)し、約50 μ gの精製蛋白質を得た。本標品をアミノ末端分析機(ABI ペプチドシーケンサー)にかけ、以下のN末端アミノ酸配列を得た。

【0012】 XGNNDEsNI sFkDI s gY

(大文字は確定したアミノ酸を示し、小文字は可能性のあるアミノ酸を示す)

本アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを下記のように作製し、cDNAライブラリースクリーニング

のプロープとした。N末端アミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

【0013】 GGA AAC AAC GAT GAA TCC AAT ATT TCA TT
C AAA GAG AAA GAT AT (44bp)

＜mRNAの抽出＞P39の親株及びP39 (+) 亜株からInvitrogene mRNA抽出キット (Invitrogene製) を用いてmRNAを精製した。実際的にはmanufacturer's bookletに拠って再現的に精製できた。各種細胞株、各ヒト臓器からも同様の方法でmRNAを抽出した。

＜cDNAライブラリーの作成＞P39 (+) 亜株から得たmRNAをRNase(-) reverse transcriptase (GIBCOBRL製) によりcDNAに変換した。さらにDNA polymerase (Toyobo製) により二重鎖DNAとして、これにBstX Iリンカーを付加した。リンカー付加DNAをBstX I切断したpCEV4に組み込み、発現法 (抗体スクリーニング)、オリゴプローブ法 (オリゴヌクレオチドスクリーニング)、いずれでもスクリーニングが可能なcDNAライブラリーを作製した。オリゴプローブ法用にはpCEV4/cDNAをMC1803大腸菌株 (大阪大学野島博士より恵与) にエレクトロポレーション法により注入した。発現法用にはpCEV4/cDNAをCOS細胞 (ATCCより購入) にトランスフェクトした。トランスフェクトは、エレクトロポレーション法で行った。発現法では陽性クローンを得られなかったため、前者についてのみ以下に述べる。

＜陽性クローンのスクリーニング＞約10⁶個のMC1803コロニーを、すでに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、2個の陽性クローンを得た。スクリーニングはニトロセルロースシートを用いた通常法 (Maniatis et al., Molecular cloning, 1989) に拠った。2個の陽性クローンはともに0.9kbで完全長でないことが推定された。

＜cDNAの塩基配列の決定＞2個の陽性クローンをDNAシーケンサー (ABI373A) にかけて全塩基配列を決定した。先にアミノ末端分析で決定したシーケンスを含むが、ATG開始コドン、ポリAシグナル、ポリAテイルを含まないシーケンスが得られた。本シ

ークエンスをもとに3' RACE法、5' RACE法を併用し、図2及び図3に示す最終シーケンスを得た。

【実施例2】 ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティングは、約10μgのRNAを各レーンにアガロース電気泳動し、既報 (Maniatis et al., Molecular cloning, 1989) に従ってブロットを行った。アマーシャム社のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、ランダムプライマー法でラベルしたプローブとブロットを60℃、4時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに65℃、0.2×SSCでwashingを行い、オートラジオグラフィーで陽性バンドを検知した。この結果を図4に示す。図4に示すようにP39 (+) 亜株ではM161Agに対応するRNAが検出されたが、P39 (-) 亜株では検出されなかった。

【実施例3】 RT-PCR法

Perkin Ermer Cetusのキットを用いてプロトコールに準拠して行った。もとのP39 (+) のmRNAから全長の図2及び図3に示したcDNAがRT-PCR法で得られること、P39親株を含んだ他のmRNAから同様のcDNAが得られないことを確認した。

【0014】

【発明の効果】本発明は、新規な膜タンパク質M161Ag及びそれをコードするcDNAを提供する。M161Agは、ヒト骨髄性白血病細胞のクリアランスを促進するので、本発明は、白血病の治療薬開発等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 M161Agのアミノ酸配列を表す図

【図2】 M161AgをコードするcDNAの塩基配列の前半部分を表す図

【図3】 M161AgをコードするcDNAの塩基配列の後半部分を表す図

【図4】 P39株由来のRNAの電気泳動の結果を示す写真

【図5】 P39株等のmRNAから調製したcDNAの電気泳動の結果を示す写真

【図6】 mixture primerの塩基配列を表す図

【図1】

1	11	21	31	41	51
MKSKSKLL	LSPIAAILPA	VAYSCONNDE	SNISFKEKIM	SKYTTTNANG	KQVVKNAELL
61	71	81	91	101	111
KLKPVLITDB	OKIDDKSPNQ	SAFEALKAIN	KQTGIEINNV	EPSSNFESAY	NSALSAGHKI
121	131	141	151	161	171
*VLKQFKHQ	SUKQYIDHR	BELENNQKI	KGIDFIDETE	YK*PYSLQFN	IKESAFTTGY
181	191	201	211	221	231
AIAS*LSEQD	ESKRYVASFO	GGAPFOVITP	NEOFAGOHLY	YNQKHKSSKI	YHTSPVKLDS
241	251	261	271	281	291
GFTAGEKMT	VINNVLSTP	ADVKNPHVI	LSVACPATFE	TVRLANKQGY	VIGVDSQDM
301	311	321	331	341	351
IQDKDRILTS	VLEKHKQAVY	ETLLDLILEK	BEQYEPYVVK	DKKADCK*SH	POTQKEK*HG
361	371	381	391	401	411
VAENHFSNTE	EQAKINNIK	BAIKMPKELP	EDFVKYVNSD	KALKDGNKID	NVSERLBAH
421					
SAINKAAK**					

* : セレノシステイン

** : 終止

mixture primer

5' primer

T T T A
5'-GGNAA AA GA GA -3'
C C C G

3' primer

A T T A
5'-AT TCTTIN TCNAG AA-3'
G C C G

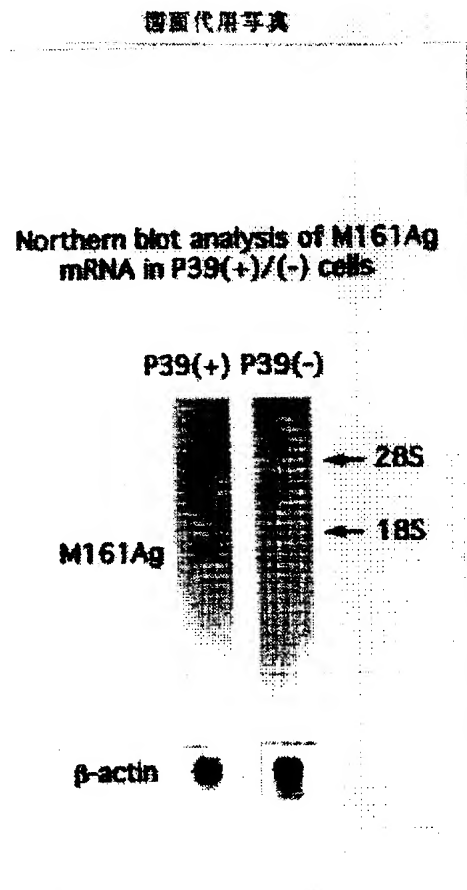
【図2】

10	20	30	40	50	60
AGGAGATTA	AGGAGATTA	TCGAAAGAA	TTTATGAGC	ATGAGATCT	ATGAGATCT
70	80	90	100	110	120
TTCTTCGAC	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	ATGAGATCT	TCGAAAGAA
130	140	150	160	170	180
AGGAGATCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA
190	200	210	220	230	240
CTGATCTCT	AAATGAGAA	CTGATCTCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	TCGAAAGAA
250	260	270	280	290	300
CTGATCTCT	ATGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	CTGATCTCT
310	320	330	340	350	360
TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA
370	380	390	400	410	420
AGGAGATCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	CTGATCTCT
430	440	450	460	470	480
ATGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	CTGATCTCT
490	500	510	520	530	540
TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA
550	560	570	580	590	600
CAAGAGATCT	TCGAAAGAA	CTGATCTCT	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	AGGAGATCT
610	620	630	640	650	660
CTGATCTCT	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA
670	680	690	700	710	720
CTGATCTCT	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA	TCGAAAGAA
730	740	750	760	770	780
ATGAGATCT	AGGAGATCT	CTGATCTCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	TCGATCTCT
790	800	810	820	830	840
CTGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	CTGATCTCT	CTGATCTCT	CTGATCTCT

【図3】

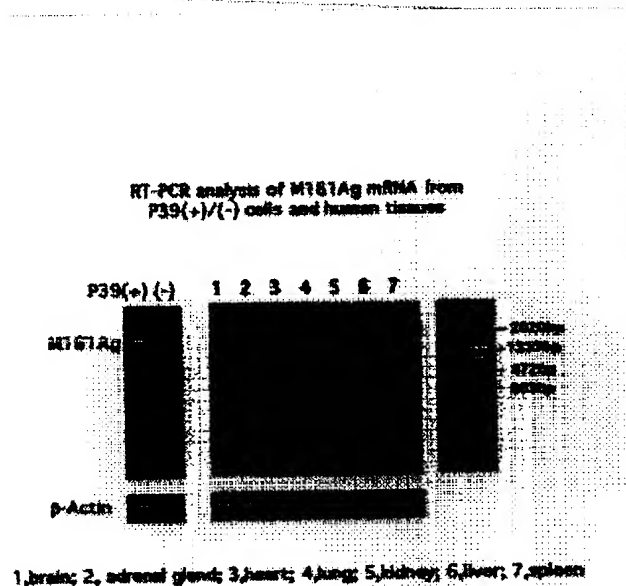
650	660	670	680	690	700
CTGATCTCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	CTGATCTCT
710	720	730	740	750	760
AGGAGATCT	CTGATCTCT	AGGAGATCT	TCGAAAGAA	AGGAGATCT	CTGATCTCT
770	780	790	800	810	820
AGGAGATCT	TCGAAAGAA	TCGATCTCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	TCGATCTCT
830	840	850	860	870	880
ATGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	CTGATCTCT	TCGATCTCT
890	900	910	920	930	940
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
950	960	970	980	990	1000
AGGAGATCT	TCGATCTCT	TCGATCTCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	TCGATCTCT
1010	1020	1030	1040	1050	1060
ATGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	CTGATCTCT	TCGATCTCT
1070	1080	1090	1100	1110	1120
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1130	1140	1150	1160	1170	1180
AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1190	1200	1210	1220	1230	1240
TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1250	1260	1270	1280	1290	1300
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1310	1320	1330	1340	1350	1360
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1370	1380	1390	1400	1410	1420
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1430	1440	1450	1460	1470	1480
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1490	1500	1510	1520	1530	1540
TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1550	1560	1570	1580	1590	1600
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1610	1620	1630	1640	1650	1660
AGGAGATCT	TCGATCTCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT	AGGAGATCT
1670	1680				

【図4】



【図5】

図5 代替写真



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶
A 61 K 38/00

識別記号 庁内整理番号

FI
A 61 K 37/02

技術表示箇所

ADV
ZNA

ADV

(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUINGCOUNTRY]

Japanese Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報 (A)

Laid-open (Kokai) patent application number
(A)

(11)【公開番号】

特開平9-157295

(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]

Unexamined-Japanese-Patent 9-157295

(43)【公開日】

平成9年(1997)6月17
日

(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]

June 17th, Heisei 9 (1997)

(54)【発明の名称】

膜タンパク質M161Ag及び
それをコードするcDNA

(54)[TITLE]

Membrane protein M161Ag and cDNA which
codes it

(51)【国際特許分類第6版】

C07K 14/705
C07H 21/04
C12N 15/09 ZNA
C12P 21/02
// A61K 31/70
38/00
ADV
(C12N 15/09 ZNA
C12R 1:91)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(51)[IPC]

C07K14/705
C07H21/04
C12N15/09 ZNA
C12P21/02
//A61K31/70
38/00
ADV
(C12N15/09 ZNA
C12R 1:91)
(C12P21/02
C12R 1:19)

【FI】

C07K 14/705
C07H 21/04 B
C12P 21/02 C
A61K 31/70
C12N 15/00 ZNA A
9282-4B
A61K 37/02
ADV

【FI】

C07K14/705
C07H21/04 B
C12P21/02 C
A61K31/70
C12N15/00 ZNAA9282-4B
A61K37/02
ADV

【審査請求】 未請求

[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED

【請求項の数】 2

[NUMBEROFCLAIMS] Two

【出願形態】 FD

[Application form] FD

【全頁数】 6

[NUMBEROFPAGES] Six

(21) 【出願番号】
特願平 7 - 3 4 4 5 0 4(21)[APPLICATIONNUMBER]
Japanese-Patent-Application-No. 7-344504(22) 【出願日】
平成 7 年 (1 9 9 5) 1 2 月 5
日(22)[DATEOFFILING]
December 5th, Heisei 7 (1995)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】
3 9 6 0 2 0 8 0 0[IDCODE]
396020800【氏名又は名称】
科学技術振興事業団

Japan Science & Technology Corporation

【住所又は居所】
埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8
号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 瀬谷 司

Tsukasa Seya

【住所又は居所】
奈良県奈良市鶴舞西町 2 丁目 1
0, E - 1 0 6

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 松本 美佐子

Misako Matsumoto

【住所又は居所】
奈良県生駒市北大和 2 丁目 2 0

[ADDRESS]

- 7

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】 平木 祐輔 Yusuke Hiraki

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【解決手段】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag、及び前記アミノ酸配列をコードする cDNA

[SOLUTION]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1, And cDNA which codes the above-mentioned amino acid sequence.

【効果】

新規な膜タンパク質 M161Ag 及びそれをコードする cDNA を提供する。

[EFFECTS]

Novel membrane protein M161Ag and cDNA which codes it are provided.

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項 1】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag。

[CLAIM 1]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

【請求項 2】

図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列をコードする cDNA。

[CLAIM 2]

The amino acid sequence shown in Figure 1, Or cDNA which codes the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なタンパク質M161Ag及び当該タンパク質をコードするcDNAに関する。

[TECHNICAL FIELD]

This invention relates to novel protein M161Ag and cDNA which codes concerned protein.

【0002】

[0002]

【従来の技術】

M161Agは、ヒト骨髓性白血病細胞株P39(+)に含まれる膜タンパク質であり、第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクローナル抗体の作成はすでになされている (Matsumoto et al., J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995))

[PRIOR ART]

M161Ag is membrane protein contained in the human myelocytic-leukemia cell strain P39 (+).

It has functions, such as activation of a second complement activated route, and the adsorption of a complement C3.

An isolated purification of this protein and preparation of a monoclonal antibody are already made (Matsumoto et al., J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995)).

【0003】

[0003]

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、様々な生理活性を有する膜タンパク質M161AgをコードするcDNAを単離し、該タンパク質のより効率的な利用手段を提供することにある。

[PROBLEM ADDRESSED]

Objective of the invention, It is in isolating cDNA which codes membrane protein M161Ag which has various biological activities, and providing use means more efficient than this protein's.

【0004】

[0004]

【課題を解決するための手段】

本発明者は、M161AgのN末端アミノ酸配列よりプローブ

[SOLUTION OF THE INVENTION]

This inventor determines a probe from N terminal amino acid sequence of M161Ag. It succeeds in isolating a positive clone from

を決定し、これを用いて P 3 9 の cDNA ライブラリーから陽性クローンを単離することに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明は、図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質 M161Ag である。

【0005】

また、本発明は、図 1 に示すアミノ酸配列、又は図 1 に示すアミノ酸配列を実質的に同一なアミノ酸配列をコードする cDNA である。以下、本発明を詳細に説明する。本発明の cDNA は、以下のようにしてクローニングすることができる。まず、精製された M161Ag のアミノ酸配列より、プローブを作成する。M161Ag は骨髓性白血病細胞株 P 3 9 の亜株である P 3 9 (－) より、前記した J.Exp.Med., 181, 115-125 (1995) 記載の方法に従って、単離精製することができる。P 3 9 は、ジャパニーズ・キャンサー・リサーチ・リソース・バンクが保管している。P 3 9 (－) 亜株は、親株の P 3 9 (＋) を低温 (12℃) 下、48 時間培養し、アポトーシス耐性を獲得した株の中から得られる。

【0006】

次に、P 3 9 より、全 mRNA を抽出し、これから cDNA を合成する。合成した cDNA を適当なベクターに挿入し、宿主となる微生物を形質転換し、cDNA ライブラリーを作成す

cDNA library of P39 using this.

This invention was completed.

That is, this invention, the amino acid sequence shown in Figure 1, Or it is protein M161Ag which has the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

[0005]

Moreover, this invention, the amino acid sequence shown in Figure 1, Or it is cDNA which codes the substantially same amino acid sequence as the amino acid sequence shown in Figure 1.

Hereafter, this invention is explained in detail.

cDNA of this invention can be cloned as follows.

First, a probe is prepared from the amino acid sequence of purified M161Ag.

M161Ag can be isolate-and-purified from P39 (+) which is the substrain of the myelocytic-leukemia cell strain P39, according to the method of above-mentioned J.Exp.Med. 181, 115-125 (1995) description.

Japanese Cancer-Research resource bank is storing P39.

P39 (+) substrain cultivates P39 (+) of a parent strain for 48 hours under low temperature (12 degrees-Celsius), and is obtained out of the strain which acquired apoptosis resistance.

[0006]

Next, from P39, mRNAs of total are extracted and cDNA is synthesized after this.

Compound cDNA is inserted in a suitable vector and the microorganism used as a host is transformed.

cDNA library is prepared.

Commercially available Invitrogen mRNA

る。P39 (+) より、mRNA を抽出する方法は、市販の Invitrogen mRNA 抽出キットにより行うことができる。cDNA のクローニングは、例えば、pCEV4-ベクターの組み込まれた P39 (+) 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。ベクターとしては、他に pBluescript などを用いることができる。形質転換する微生物としては、例えば、大腸菌株、MC1803 などを用いることができる。スクリーニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行うことができる。

【0007】

クローニングされた cDNA の大きさは、約 1.3 kb であり、その塩基配列は図 2 及び図 3 に示す通りである。これから推定されるアミノ酸配列、即ち、M161Ag のアミノ酸配列は、図 1 に示す通りである。図 1 に示すようにこのタンパク質の 24 個のシグナルペプチドを含む 428 個のアミノ酸からなり、推定分子量は 42 kDa である。

【0008】

本発明の対象となるタンパク質のアミノ酸配列は、図 1 に示す配列に限定されず、これと実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明の技術的範囲に含まれる。ここで、「実質的に同一」とは、図 1 に示すアミノ酸配列の幾つかのアミノ酸

extracting kit can perform the method of extracting mRNA from P39 (+).

A cloning of cDNA can be performed by for example, screening cDNA library of P39 (+) cell where pCEV4 vector was integrated.

As a vector, pBluescript etc. can be used other.

As the microorganism to transform, for example, an Escherichia-coli strain and MC1803, etc. can be used.

A screening can be performed by the colony hybridization method.

[0007]

The sizes of cloned cDNA are about 1.3 kbs.

The base sequence is as being shown in Figure 2 and 3.

The amino acid sequence estimated from now on, that is, the amino acid sequence of M161Ag is as being shown in Figure 1.

As shown in Figure 1, it consists of 428 amino acids containing 24 transit peptides of this protein.

Presumed molecular weight is 42kDas.

[0008]

The amino acid sequence of protein used as the subject of this invention is not limited to the sequence shown in Figure 1. Protein which has the substantially same amino acid sequence as this is also contained in the technical range of this invention.

Here, "it is substantially the same" is the sequence which the change of deletion, substituted, addition, etc. produced about

残基について、欠失、置換、付加等の変化が生じた配列であって、前記配列と同様に第2補体活性化経路の活性化や補体C3の吸着など機能を有するような配列をも含むという意味である。同様に本発明のcDNAの塩基配列も、図1に示すアミノ酸配列をコードするものに限定されず、これと実質的に同一な塩基配列を有するDNAも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0009】

M161Agは、細胞のアポトーシスに関連して生合成される膜タンパク質であり、癌細胞、特にヒト骨髓性白血病細胞のクリアランスを促進する。従って、M161Ag及びそれをコードするcDNAは、白血病などの治療薬として利用することができる。

【0010】

【発明の実施の態様】

【0011】

【実施例】

【実施例1】

cDNAのクローニング
 <プローブの作成> M161Agを抗体(M161Ab, 文献J.Exp.Med.,181,115-125(1995)参照)をプローブとしてP39(一)株 3×10^{10} 個の細胞可

several amino acid residues of the amino acid sequence shown in Figure 1, comprised such that it is the meaning that the sequence which has functions, such as activation of a second complement activated route and the adsorption of a complement C3, as same as the above-mentioned sequence is also contained.

Similarly, the base sequence of cDNA of this invention, It is not limited to that which codes the amino acid sequence shown in Figure 1. DNA which has the substantially same base sequence as this is also contained in the technical range of this invention.

[0009]

M161Ag is membrane protein by which a biosynthesis is carried out in relation to the apoptosis of a cell.

Clearance of a cancer cell, in particular a human myelocytic-leukemia cell is accelerated.

Therefore, M161Ag and cDNA which codes it can be utilized as therapeutic agent, such as leukemia.

[0010]

[The aspect of implementation of invention]

[0011]

[Example]

[Example 1]

A cloning of cDNA

<Preparation of a probe> M161Ag was purified from the cell solubilization fraction of 3*1010 P39 (+) strains, having made the antibody (M161Ab and literature J.Exp.Med., 181,115-125 (1995) reference) as the probe (a purification method, above literature).

溶化画分より精製（精製法、上記文献）し、約50 μ gの精製蛋白質を得た。本標品をアミノ末端分析機（ABI ペプチドシーケンサー）にかけ、以下のN末端アミノ酸配列を得た。

[0012]

XGNNDEsNIsFkDIsgY

（大文字は確定したアミノ酸を示し、小文字は可能性のあるアミノ酸を示す）

本アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを上記のように作製し、cDNAライブラリースクリーニングのプローブとした。N末端アミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

[0013]

GGA AAC AAC GAT GAA TCC
AAT ATT TCA TTC AAA GAG
AAA GAT AT (44bp)

<mRNAの抽出> P39の親株及びP39 (+) 亜株からInvitrogene mRNA抽出キット (Invitrogene 製) を用いてmRNAを精製した。実際的にはmanufacturer's booklet に拠って再現的に精製できた。各種細胞株、各ヒト臓器からも同様の方法でmRNAを抽出した。

<cDNAライブラリーの作成> P39 (+) 亜株から得たmRNAをRNase(-) reverse transcriptase (GIBCOBRL 製) によりcDNAに変換した。さらにDNA polymerase (Toyobo 製) により二重鎖DNAとして、これにBstXIリンカーを付

The purification protein of about 50 micro-g was obtained.

This preparation was applied to the amino terminal-analysis machine (ABI peptide sequencer), and the following N terminal amino acid sequences were obtained.

[0012]

XGNNDEsNIsFkDIsgY

(A capital letter showing the settled amino acid. A small letter shows a possible amino acid.)

An oligonucleotide probe is produced as follows from this amino acid sequence.

It made as the probe of cDNA library screening.

The oligonucleotide estimated from N terminal amino acid sequence was synthesized as follows.

[0013]

GGAAACAACGATGAATCCAATATTTTCATTCA
AAGAGAAAGATAT(44bp)

<Extracting of mRNA> mRNA was purified from the parent strain of P39, and P39 (+) substrain using Invitrogen mRNA extracting kit (made by Invitrogene).

In fact, manufacturer's booklet has purified in reproduction.

mRNA was extracted by the method similar also from various kinds of cell strains and each human organ.

<Preparation of cDNA library> mRNA obtained from P39 (+) substrain was transformed into cDNA by RNase(-) reverse transcriptase (made by GIBCOBRL).

Furthermore, BstXI linker was added to this as double chain DNA by DNA polymerase (made by Toyobo).

Linker addition DNA is integrated in pCEV4 which carried out BstXI cutting. The expression method (antibody screening), the oligo probe

加した。リンカー付加DNAをBstXI切断したpCFV4に組み込み、発現法（抗体スクリーニング）、オリゴプローブ法（オリゴヌクレオチドスクリーニング）、いずれでもスクリーニングが可能なcDNAライブラリーを作製した。オリゴプローブ法用にはpCEV4/cDNAをMC1803大腸菌株（大阪大学野島博士より恵与）にエレクトロポレーション法により注入した。発現法用にはpCFV4/cDNAをCOS細胞（ATCCより購入）にトランスフェクトした。トランスフェクトは、エレクトロポレーション法で行った。発現法では陽性クローンを得られなかったため、前者についてのみ以下に述べる。

陽性クローンのスクリーニング 約 10^6 個のMC1803コロニーを、すでに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、2個の陽性クローンを得た。スクリーニングはニトロセルロースシートを用いた通常法（Maniatis et al., Molecular cloning, 1989）に拠った。2個の陽性クローンはともに0.9 kbで完全長でないことが推定された。

cDNAの塩基配列の決定 2個の陽性クローンをDNAシーケンサー（ABI373A）にかけて全塩基配列を決定した。先にアミノ末端分析で決定したシーケンスを含むが、ATG開始コドン、ポリAシグナル、ポリAテイルを含まないシーケンスが得られた。本シー

method (oligonucleotide screening), and cDNA library in which either has a possible screening were produced.

For oligo probe methods, pCEV4/cDNA was injected by the electroporation method in MC1803 Escherichia-coli strain (it is given from Dr. Nojima, Osaka university).

For expression methods, pCEV4/cDNA was transfected into COS cell (it purchases from ATCC).

The transfection was performed by the electroporation method.

By some expression method, since the positive clone was not obtained, only the former is stated below.

<A screening of a positive clone> It is screened about 106 MC1803 colonies, making the oligonucleotide which already produced as a probe.

Two positive clones were obtained.

The screening was based on the usual method (Maniatis et al., Molecular cloning 1989) using the nitrocellulose sheet.

Both two positive clones are 0.9 kb, and it was estimated that it is not complete length.

<Determination of the base sequence of cDNA> Two positive clones were applied to the DNA sequencer (ABI373A), and base sequences of total were determined.

The sequence previously determined with the amino terminal analysis is contained.

However, the sequence which does not contain ATG initiating codon, a poly A signal, and a poly A tail was obtained.

3'RACE method and 5'RACE method are used together on the basis of this sequence.

The final sequence shown in Figure 2 and 3 was obtained.

クエンズをもとに3' RACE法、5' RACE法を併用し、図2及び図3に示す最終シーケンスを得た。

【実施例2】

ノーザンブロッティング
ノーザンブロッティングは、約10 μ gのRNAを各レーンにアガロース電気泳動し、既報 (Maniatis et al., Molecular cloning, 1989) に従ってブロットを行った。アマーシャム社のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、ランダムプライマー法でラベルしたプローブとブロットを60°C、4時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに65°C、0.2×SSCでwashingを行い、オートラジオグラフィで陽性バンドを検知した。この結果を図4に示す。図4に示すようにP39 (-) 亜株ではM161Agに対応するRNAが検出されたが、P39 (-) 亜株では検出されなかった。

【実施例3】

RT-PCR法
Perkin Ermer Cetusのキットを用いてプロトコールに準拠して行った。もとのP39 (-) のmRNAから全長の図2及び図3に示したcDNAがRT-PCR法で得られること、P39親株を含んだ他のmRNAから同様のcDNAが得られないことを確認した。

【0014】

[Example 2]

Northern blotting

A northern blotting carries out the agarose electrophoresis of the RNA of about 10 micro-g at each lane.

It blotted according to the previous report (Maniatis et al., Molecular cloning 1989).

60 degrees-Celsius and 4 hour hybridization were performed the probe and a blotting which carried out the label by the random primer method, using the hybridization buffer of an Amersham.

Furthermore washing was performed by 65 degrees-Celsius and 0.2×SSC, and the positive band was detected with autoradiography.

This result is shown in a Figure 4.

As shown in a Figure 4, RNA corresponded to M161Ag was detected in P39 (+) substrain.

However, in P39 (-) substrain, it was undetectable.

[Example 3]

RT-PCR process

According to the protocol, it performed using the kit of PerkinErmerCetus.

It confirmed that cDNA shown in Figure 2 and 3 of a full length is obtained from original mRNA of P39 (+) by RT-PCR process, and that similar cDNA was not obtained from other mRNA containing P39 parent strain.

[0014]

【発明の効果】

本発明は、新規な膜タンパク質 M161Ag 及びそれをコードする cDNA を提供する。M161Ag は、ヒト骨髓性白血病細胞のクリアランスを促進するので、本発明は、白血病の治療薬開発等に利用することができる。

[EFFECT OF THE INVENTION]

This invention provides novel membrane protein M161Ag and cDNA which codes it.

M161Ag accelerates clearance of a human myelocytic-leukemia cell.

Therefore this invention is applicable to therapeutic-agent development of leukemia etc.

【図面の簡単な説明】**[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]****【図 1】**

M161Ag のアミノ酸配列を表す図

[FIGURE 1]

The figure showing the amino acid sequence of M161Ag

【図 2】

M161Ag をコードする cDNA の塩基配列の前半部分を表す図

[FIGURE 2]

The figure showing the first-half part of the base sequence of cDNA which codes M161Ag

【図 3】

M161Ag をコードする cDNA の塩基配列の後半部分を表す図

[FIGURE 3]

The figure showing the second-half part of the base sequence of cDNA which codes M161Ag

【図 4】

P39 株由来の RNA の電気泳動の結果を示す写真

[FIGURE 4]

The photograph in which the result of the electrophoresis of RNA derived from P39 strain is shown

【図 5】

P39 株等の mRNA から調製した cDNA の電気泳動の結果を示す写真

[FIGURE 5]

The photograph in which the result of the electrophoresis of cDNA prepared from mRNA such as P39 strain etc. is shown

【図 6】

mixture primer の塩基配列を表す図

[FIGURE 6]

The figure showing the base sequence of mixture primer

【図 1】**[FIGURE 1]**

```

1  MKKSKKILLC  11  LSPILAILPA  21  VAVSQONNDE  31  SNISFKKKDI  41  SKYTTTNANG  51  KQVVKNALL
61  KIKPVLITDE  71  GKIDDKSPNQ  81  SAFEALKAIN  91  KQTGHEINNV  101  EPSSNFESAY  111  NSALSAGHKI
121  *VLNGFKHQQ  131  SIKQYIDAGR  141  EELERNQIKI  151  KIDFHDHETE  161  YK*FYSLQFN  171  IKESAFITGY
181  AIAS*LSEQD  191  FSKRVVASFG  201  GGAFPGVITF  211  NEGFAKGILY  221  YNQKHKSSKI  231  YITSPVKIDS
241  GFTACEKMNT  251  VINNVLSSTP  261  AIDVKYNPHVI  271  LSVAGPATFE  281  TVRLANKGOY  291  VIGVDSQGM
301  IQDKDKILTS  311  VLKHKQAVY  321  EITLDDILEK  331  EGGYKPYVVK  341  DKKADKK*SH  351  FGTQKEK*KG
361  VAENHHSNTE  371  EQAKINNKIK  381  EAIKMFRELP  391  EDVKYINSD  401  KALKDGNKID  411  NVSEKLEAH
421  SAINKAARK**

```

* : セレノシステイン

** : 終止

Figure 1

*: Selenocysteine, **: Ending

【図 2】

[FIGURE 2]

```

10  20  30  40  50  60
RAGGAGATTA  TATGMAAAG  TCAAAAAA  TTTATTAGG  ATTGAGTCT  ATTGCTGCTA
70  80  90  100  110  120
TTCTTCCTGC  AGTAGAGCTT  TCTGCGGAA  ACRACGATG  ATCCACATT  TCATTCAAAG
130  140  150  160  170  180
AGAAAGATAT  TACTAAATAT  ACCACAGAA  ATGCTAATG  AAACACAGTT  GTTAAAGAGG
190  200  210  220  230  240
CTGAATTTGT  AAAATGAAA  CGGTCTCTA  TTACAGATG  AGGTAAATX  CATGATAAT
250  260  270  280  290  300
CATTCAGCA  ATCAGCTTT  GAGCTTTAA  AAGCTATTA  TACACAACT  GGTATTGAAA
310  320  330  340  350  360
TTACATGTT  TCAACCTAG  TCAACTTTC  AAAGTCTTA  CAACAGTGA  GTTACAGCG
370  380  390  400  410  420
GACACAAAT  TTGAGTACT  AATGCTTCA  AACACAGCA  ATCTATTAA  CATACATTC
430  440  450  460  470  480
ATGCTCAG  AGAAGACTT  GAACAAATC  AATCAAAAT  CATGCTATC  GACTTTGATA
490  500  510  520  530  540
TTGAACAGA  GTACAGTGA  TTTACTCAT  TACATTTAA  TATTAAAGAA  TGTGATTTA
550  560  570  580  590  600
CAACAGCTA  TGAATGCA  AGTTGATTAA  CTGACRAGA  TGAAGTAAA  AGAGTGTTC
610  620  630  640  650  660
CATTAATTGG  TGGAGTGA  TTCCAGGTG  TTACACATT  TAAGTAAGT  TTGCAAAAG
670  680  690  700  710  720
GTACTATA  CTACAGCAA  AATCATAAAT  CAAGTAAAT  TTACACACA  TCAGCTGTTA
730  740  750  760  770  780
AATGAGCTC  AGGTCTACT  GTGCTGAAA  AATGAGAAC  TGTATTAAT  AATGTTTAT
790  800  810  820  830  840
CTTCAAGAC  AGCTGATCT  AAACAGAGC  CACAGTTAT  CTTATTTGT  GTGGAAGTC

```

Figure 2

Initiating codon

[FIG 3]

[FIGURE 3]

```

      850      860      870      880      890      900
GACGATTTGA AACTGGAACA TTAGGGAACA AAGGTGACA TGAATTTGT GTTGATTCAG
      910      920      930      940      950      960
AAGGAGGAT GATTCAGAC AAGGAGGAA TTCTACATC AGTCTTAAA CACTTAAAC
      970      980      990      1000      1010      1020
AAGCTGTTTA TGAACATTA TTGAGCTTA TTCTGAAA AAGGAGGAA TATAAGCAT
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATGTAGTTAA AGAGAAAAA GAGAGAAAA AATGAGGCA GTTGGAACT CAAAAAGAA
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
AATGATGCG TTGAGGAAA AAGGATTTT CAAATACAA AAGAGGCA AATTTATA
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AGAAATTTAA AAGGAAAT AATGATTTA AAGATTTAC AAGAGATTC GTTAAATTA
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
TTAATAGCA CAAAGCTTA AAGGAGGTA AATGATTTA CAAATGAT GAGAGATTA
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
AAGCAATAT TTCTGATTT AAGAGGCG CAAATGAT AATGAAAAA ATGCTGAAA
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
AATGAGGCA GTTGTATTT TAAATAGCA AAGGATTTT TTCTGTTA ATTCTGAG
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
AATTAGATA AAGGATTTT TGGGTTTGT TTCTGATTA AGATTAATA GAGGAGGAG
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
GTTGTAAAC TGGGTAGTA AATGAGGTT GGAATAGCA AAGGTTAAG ACCAATTTAT
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
TTAATGATTT AATGATTTA GATGATAGG GTTGTGTTT GATGATTA TGAATTTT
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
ATTCTGATTT TAAATAGG AATGATTTA GAGGATTTT TAAAAAAA AAAAAAAA
      1630      1640      1650      1660      1670      1680
A

```

Figure 3

Ending codon

[FIG 6]

[FIGURE 6]

```

mixture primer

5' primer
      T T T A
5'-GNNAA AA GA CA-3'
      C C C G

3' primer
      A T A
5'-AT TCTNN TCNAG AA-3'
      C C C G

```

Figure 6 (top to bottom)

5' side primer, 3' side primer

【図 4】

[FIGURE 4]

図面代用写真

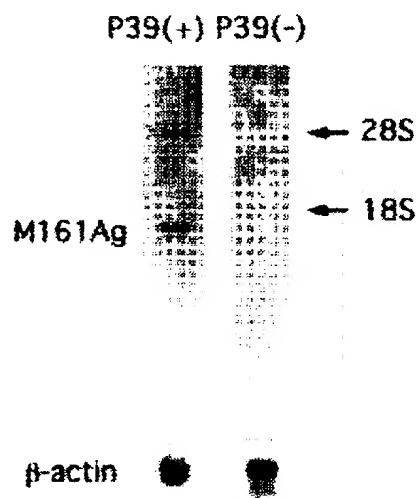
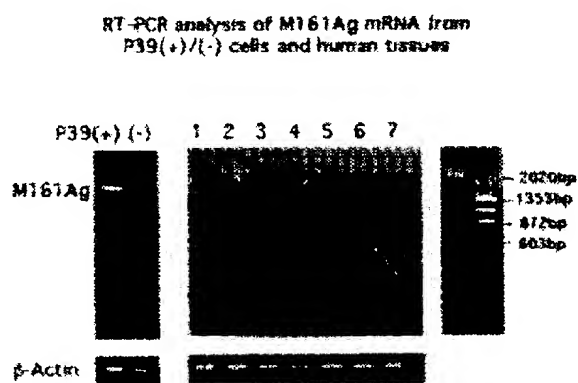
Northern blot analysis of M161Ag
mRNA in P39(+)/(-) cells

Figure 4: Replaced by photo

【図 5】

[FIGURE 5]

RT-PCR analysis of M161Ag mRNA from P39(+)/(-) cells and human tissues



1, brain; 2, adrenal gland; 3, heart; 4, lung; 5, kidney; 6, liver; 7, spleen

Figure 5: Replaced by photo